

Aus der I. Medizinischen Klinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. R. Duesberg

Untersuchungen über den Einfluß des Natriumsalzes
der Ölsäure als Vertreter der unveresterten
Fettsäuren des Plasmas auf die Aggregation
menschlicher Thrombozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz

vorgelegt von
Hans-Günther Döppenschmidt
aus Germersheim

Mainz 1968
—

Aus der I. Medizinischen Klinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. R. Duesberg

Untersuchungen über den Einfluß des Natriumsalzes
der Ölsäure als Vertreter der unveresterten
Fettsäuren des Plasmas auf die Aggregation
menschlicher Thrombozyten

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz

vorgelegt von

Hans-Günther Döppenschmidt

aus Germersheim

Mainz 1968

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Thews

Referent: Priv. Doz. Dr. F. Gramlich

Korreferent: Prof. Dr. R. Duesberg



Inhaltsübersicht

	Seite
A: Einleitung	1
B: 1.) Bedeutung der Thrombozytenaggregation	3
2.) Begriff der Thrombozytenaggregation, Definition und Abgrenzung	4
3.) Zum Mechanismus der Thrombozytenaggregation	5
4.) Literaturvergleich bezüglich der Wirkung von Fettsäuren auf die Aggregation der Thrombozyten	6
5.) Fragestellung	7
C: Material und Methode	9
D: Ergebnisse	14
Vorversuche	14
1.) Ausmaß der bei der Lipolyse während des Ablaufs der Versuche freiwerdenden unveresterten Fett- säuren	14
2.) Ausschluß von Extinktionsveränderungen im plättchenfreien Plasma nach Natrium-Oleat- Zusatz	15
3.) Fehlerbreite der Messungen	15
Hauptversuche	16
1.) Einfluß des Natrium-Oleats auf die Aggregation der Thrombozyten in plättchenreichem Plasma	16
2.) Einfluß verschiedener Natrium-Oleat-Konzen- trationen auf die ADP-induzierte Thrombozyten- aggregation	18
3.) Tabellarische Zusammenfassung der Versuchser- gebnisse	29
E: Diskussion	36
F: Zusammenfassung	43
G: Literaturverzeichnis	45

A: Einleitung

So sinnvoll und wichtig das Zusammenlagern der Blutplättchen bei Gefäß- und Gewebsläsionen im Rahmen der Hämostase ist, so verhängnisvoll kann die Zusammenlagerung von Thrombozyten im Gefäßsystem selbst werden und Anlaß zu verschiedenen Erkrankungen geben. Die unmittelbaren Folgen einer intravasalen Thrombozytenverklumpung sind die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und die Bildung von Thromben.

Das Haften der Thrombozyten am zerstörten Endothel und aneinander wurde bereits im vergangenen Jahrhundert von BIZZAZZO (4), HAYEM (33), EBERT und SCHIMMELBUSCH (23) und anderen Autoren als initialer Prozeß der Hämostase und der Thrombose beschrieben.

Seit dieser Zeit ist die Fähigkeit der Thrombozyten, an Gewebe und aneinander zu kleben, als Grundlage sowohl physiologischer als auch pathologischer Vorgänge bekannt. Hiermit ist jedoch die Aufgabe der Blutplättchen noch nicht erschöpft. Ihnen kommt im weiteren Verlaufe der Blutgerinnung und Blutstillung eine ganz wesentliche Rolle zu. Kontraktion der kleinsten Blutgefäße, Bildung der Plasmathrombokinase, Beschleunigung der Fibrinbildung, Retraktionsförderung und Kapillarabdichtung sind einige der Funktionen, die durch die Blutplättchen erfüllt werden (53).

Die enge Beziehung der Thrombozyten mit dem Vorgang der Gerinnung legte die Vermutung nahe, daß auch der aggregationsauslösende Faktor unter den plasmatischen Gerinnungsfaktoren zu finden sei. Diese Frage wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht und diskutiert. Dabei ergaben sich Hinweise, welche die Beteiligung der Gerinnungsfaktoren immer mehr in Frage stellten und einen Mechanismus in Betracht zogen, der mit der Gerinnung im klassischen Sinne keine Verbindung hat:

- 1.) Die Faktoren II, V, VII, VIII, IX und X scheinen keinen unmittelbaren Einfluß auf die Thrombozytenaggregation zu besitzen (56, 13).
- 2.) Die Wirkung der kontaktsensiblen Faktoren erklärt nur ungenügend den Vorgang der Aggregation (55).
- 3.) Plättchen in heparinisiertem Plasma zeigen normale Aggregation.
- 4.) HELLEM beschreibt 1960 einen hitzestabilen, proteinfreien, dialysierbaren Extrakt aus Erythrozyten, der in vitro Thrombozytenaggregation auslöst (34).

GAARDER identifizierte diesen von HELLEM "Faktor R" genannten Stoff chromatographisch als Adenosindiphosphat (30). Hiermit war der Startschuß für eine sehr große Anzahl von Untersuchungen auf diesem Gebiet gegeben. Mit ADP kann methodisch einfach eine Thrombozytenaggregation ausgelöst werden, die der z.B. bei Endothelzerstörung beobachteten Aggregation mikroskopisch gleicht (29), aber unabhängig von Gerinnungsvorgängen studiert werden kann.

B: 1.) Bedeutung der Thrombozytenaggregation

Ohne einen umfassenden Bericht über die Bedeutung der Thrombozytenaggregation zu geben, seien hier einige Problemkreise genannt, die in den letzten Jahren in diesem Zusammenhang besprochen wurden.

Sowohl bei Arteriosklerose als auch bei Endangitis obliterans beginnt die Entstehung des weißen Abscheidungsthrombus mit einem Haften der Thrombozyten an Bindegewebsfasern und aneinander. In diesem Stadium hat das Geschehen mit den erst später ablaufenden Gerinnungsvorgängen noch nichts gemein (21). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen weder Fusion der Plättchen noch Fibrinablagerungen (29). Mit den derzeit üblichen Antikoagulantien kann dieser Vorgang nicht oder nur ungenügend beeinflusst werden (21). Hierüber gibt es jedoch unterschiedliche, zum Teil sich widersprechende Angaben (48, 19, 2, 3).

JENEVEIN und WEISS (39) beschrieben zahlreiche thrombozytäre Aggregate in den Kapillaren von Herz, Nieren und Lungen nach Transfusion großer Blutmengen. Sie wurden autoptisch an 13 Patienten nachgewiesen, die im Gefolge von Herzoperationen verstorben waren.

Mehrfach wurden massive Thrombozytenaggregationen bei extrakorporaler Zirkulation beobachtet (38, 54). Es wird vermutet, daß diese eine häufige Ursache der Mikroembolie im Verlaufe einer solchen Maßnahme darstellen.

Auch bei Schockzuständen sollen Thrombozytenaggregate auftreten. Sie sollen für die Entstehung multipler Mikroembolien verantwortlich sein und gemeinsam mit anderen Faktoren die Mikrozirkulation beeinflussen (38, 53).

2.) Begriff der Thrombozytenaggregation, Definition und Abgrenzung

Noch in den Jahren 1955 und 1956 wurde von BRAUNSTEINER, sowie von BRAUNSTEINER und PAKESCH die Thrombozytenaggregation als ein von der Gerinnung unlösbarer Vorgang beschrieben, der ebenso wie jene durch Antikoagulantien unterbunden werden könne (10, 11). Im elektronenmikroskopischen Bild zeigten die Verfasser, daß die Aggregation mit einem Zerfall der Blutplättchen und dem Auftreten von Fibrinfäden einhergeht. Neueste Untersuchungen widersprechen diesen Beobachtungen in allen Punkten. Dadurch ist eine Revision des Begriffes "Thrombozytenaggregation" erforderlich geworden. Die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen weniger auf technischen Differenzen. Sie sind vielmehr auch auf nomenklatorische Unklarheiten zurückzuführen.

Was versteht man also heute unter Thrombozytenaggregation und was bezeichnen verwandte Begriffe wie z.B. Adhäsion, Agglutination etc.?

Thrombozytenaggregation ist eine reversible Zusammenlagerung von Blutplättchen. Das Wort selbst bezieht sich lediglich auf das morphologische Erscheinungsbild des Ereignisses. Es macht keine Aussage über die auslösenden Faktoren. Der Vorgang der Aggregation ist nicht mit einem Zerfall oder einer Verschmelzung der Thrombozyten identisch (37). Es besteht eine weitgehende Analogie zur Aggregation der Erythrozyten. Auch diese ist gekennzeichnet durch Reversibilität und Fehlen von Zelledefekten (25, 27). Thrombozytenagglomeration wird von einigen Autoren als Synonym für die Aggregation der Blutplättchen benutzt.

Thrombozytenadhäsion bezeichnet das Haften der Blutplättchen an Oberflächen (z.B. subendotheliale Bindegewebsfasern, Glas, Metall etc.). Im Rahmen der Gerinnung ist sie die unmittelbare Vorstufe der Aggregation.

Platelet-stickiness (Klebrigkeit) ist ein der Adhäsion nahe verwandter Begriff und bezeichnet die Fähigkeit des Haftens der Thrombozyten z.B. an Glasperlen.

Die Thrombozytenagglutination ist von der Aggregation begrifflich streng zu trennen. Hier handelt es sich um eine irreversible Verschmelzung der Plättchen (12, 14). Während BREDDIN unter der Agglutination ganz allgemein eine irreversible Reaktion versteht (14), möchte BRAUNSTEINER diesen terminus technicus ausschließlich für Verklumpungen reserviert wissen, die durch Agglutinine herbeigeführt werden.

Über die Definition des Begriffes visköse Metamorphose gibt es eine verwirrende Vielfalt von unterschiedlichen Meinungen (45). Deshalb sei hier, in Übereinstimmung mit MITCHELL und SHARP (46, 55), lediglich die Aggregation als erstes, reversibles Stadium und die Plättchenverschmelzung (Fusion, Agglutination) als zweites, irreversibles Stadium erwähnt.

Die Thrombozytenaggregation kann demnach wie folgt definiert und abgegrenzt werden: Die Aggregation der Thrombozyten ist ein reversibles Zusammenlagern von Blutplättchen. Nur solange der Beweis der Reversibilität durch die Desaggregation der Thrombozytenhäufchen gegeben ist, kann von Aggregation gesprochen werden.

3.) Zum Mechanismus der Thrombozytenaggregation

Neben ADP können auch andere Substanzen grundverschiedener Struktur eine Aggregation der Blutplättchen auslösen. Als Beispiele seien hier Trialkyl-Zinn-Derivate (51), 5-Hydroxytryptamin, Tryptamin, Adrenalin, Noradrenalin (52), Fettsäuren, Thrombin (32) und Kollagen (37) genannt. Untersuchungen der letzten Jahre lassen vermuten, daß der Wirkung dieser Stoffe ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt, nämlich die Freisetzung von ADP aus den Plättchen.

Der hohe ATP-Gehalt der Thrombozyten (6) und der rasch ablaufende Abbau dieses Nucleotids während der Gerinnung (7) sind weitere Hinweise auf die Bedeutung des ADP.

Die Konzentration von nur $0,007 \times 10^{-6}$ g ADP / ml plättchenreichen Plasmas - entsprechend etwa 100 000 Molekülen pro Thrombozyt - , die noch zum Auftreten von Plättchenaggregaten führt (50), zeigt, wie hochspezifisch diese Reaktion ist.

Obwohl der genaue Mechanismus der Thrombozytenaggregation letztlich nicht bekannt ist, so steht doch die zentrale Rolle des ADP außer Zweifel.

4.) Literaturvergleich bezüglich der Wirkung von Fettsäuren auf die Aggregation der Thrombozyten

Neben der seit Jahrzehnten bekannten Beeinflussung der Gerinnung durch die Blutlipide wird in den letzten Jahren auch deren Bedeutung für die Entstehung von Plättchenaggregaten heftigst diskutiert. Der Gedanke, der solchen Untersuchungen zugrunde liegt, ist der Nachweis eines Zusammenhangs, der möglicherweise zwischen Hyper- bzw. Dyslipämie und der Entwicklung arteriosklerotischer und thromboembolischer Erkrankungen - bedingt durch Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten - besteht. Aus der großen Klasse der Lipide sind dabei die freien Fettsäuren ganz in den Vordergrund des Interesses gerückt.

CONNOR und POOLE erzielten durch Zusatz verschiedener Fettsäuren eine deutliche Verkürzung der Thrombusbildungszeit in einem in vitro System (15, 16). Gesättigte Fettsäuren erwiesen sich dabei als wirkungsvoller als ungesättigte. Im Tierversuch bewirkte die intravenöse Injektion von Fettsäuren teils schwerwiegende Reaktionen. Thrombopenie und generali-

sierte Thrombose sind die am häufigsten beobachteten Veränderungen (58, 59). Bei entsprechender Wahl der Fettsäure und ihrer Konzentration können stärkere Gerinnbarkeit des Blutes, toxische Symptome (35) und u. U. der Tod als Folge einer massiven Thrombose auftreten (17, 20). Die thrombozytenaggregierende und thrombogene Potenz zahlreicher Fettsäuren (z.B. Behensäure, Arachinsäure, Stearinsäure, Palmitinsäure, Myristinsäure, Ölsäure, Linolsäure etc.) wurde in vitro mehrfach nachgewiesen (18, 36, 41, 43). Diese Untersuchungen wurden mit verschiedenen Methoden und sehr stark differierenden Fettsäurekonzentrationen (0,2 -35 mM) vorgenommen, so daß die Ergebnisse kein einheitliches Bild ergeben.

5.) Fragestellung

Untersuchungen über den Einfluß freier Fettsäuren, speziell der Ölsäure, auf die Aggregation menschlicher Thrombozyten schienen aus mehreren Gründen angezeigt:

- 1.) Die in der Literatur gefundenen Angaben über die Ölsäure bzw. deren Natriumsalz bezüglich ihrer thrombozytenverklumpenden Fähigkeiten sind widersprüchlich (1, 18, 35, 36). Meist wird eine plättchenaggregierende Wirkung beschrieben. Andere Autoren sprechen der Ölsäure jegliche aggregierende Eigenschaften ab (1).
- 2.) EHRLY wies eine desaggregierende Wirkung des Natriumsalzes der Ölsäure auf Erythrozytenaggregate nach (24, 27).
- 3.) Die Ölsäure hat neben der Palmitinsäure den höchsten Anteil an den in vivo vorkommenden freien Fettsäuren (40).

Es erschien daher interessant, festzustellen, ob das wasserlösliche Natriumsalz der Ölsäure als Prototyp für die im Plasma vorhandenen freien Fettsäuren Thrombozyten beeinflusst, d.h. aggregiert oder analog der Wirkung auf Erythrozytenaggregate Thrombozytenaggregate spalten kann. Im einzelnen wurden folgende Fragen an Hand von in vitro Experimenten untersucht:

- 1.) Bewirkt der Zusatz von Natrium-Oleat zu plättchenreichen Plasmen in den Endkonzentrationen von 10, 20, 40, 80 und 160 mg% eine Aggregation der Thrombozyten?
- 2.) Wie wird die Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation durch verschiedene Konzentrationen (10, 20, 40, 80, 160 mg%) von Natrium-Oleat in plättchenreichem Plasma beeinflusst?

In Vorversuchen mußten folgende Fragen geklärt werden:

- 1.) Ist für die Untersuchung des Einflusses freier Fettsäuren auf die Thrombozytenaggregation die Hemmung der Lipolyse erforderlich?
- 2.) Bewirkt der Zusatz von Natrium-Oleat zu plättchenfreiem Plasma eine Änderung der optischen Dichte, die eine Aggregation oder Desaggregation vortäuschen könnte?
- 3.) Wie groß ist die Fehlerbreite der Messungen?

C: Material und Methode

Alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur (20-22°C) und unmittelbar im Anschluß an die Blutentnahmen vorgenommen. Sämtliche Zusätze zum Plasma erfolgten in Form von 0,1 ml Lösung der entsprechenden Substanz in physiologischer Kochsalzlösung. Dabei wurden die Konzentrationen dieser Lösungen so gewählt, daß 0,1 ml ad 5 ml Plasma die angegebenen Konzentrationen, bezogen auf Plasma, ergaben.

Adenosindiphosphat

Als aggregationsauslösende Substanz wurde das Trinatriumsalz des Adenosin-5'-diphosphats der Fa. C. F. BOEHRINGER & SÖHNE, Mannheim, in einer Endkonzentration von 2×10^{-6} M/L verwendet. Die Lösung wurde täglich neu hergestellt und erst kurz vor Gebrauch dem Eisschrank entnommen.

Natrium-Oleat

Auch das Natrium-Salz der Ölsäure (rein, Pulver, RIEDEL DE HAEN AG, Seelze) wurde in 0,9% NaCl aufgelöst. Durch mäßiges Erwärmen und Rühren des Oleat-NaCl-Gemisches konnte der Lösungsvorgang beschleunigt werden. Da die anfänglich völlig klare Natrium-Oleat-Lösung nach Tagen an der Oberfläche eine trübe, gelblich-weiße Schicht aufzeigte, wurde diese Lösung ebenfalls täglich neu hergestellt.

Silikonierung

Alle Geräte, die mit Blut bzw. Plasma in Berührung kamen, wurden nach den üblichen Vorschriften silikoniert (47). Nach einmaligem Gebrauch wurden diese gründlichst gereinigt und frisch silikoniert. So war immer eine gleichmäßige Silikon-schicht gewährleistet.

Blut

Zur Untersuchung kam nur Nüchternblut von gesunden Personen zwischen 17 und 41 Jahren beiderlei Geschlechts. Nach Punktion einer Kubitalvene mit einer V2A-Kanüle Nr.18/8 wurden etwa 3-4 ml Blut in eine Spritze aspiriert. Dieses Blut wurde verworfen, um eine Gewebssaftbeimengung möglichst weitgehend zu vermeiden. Das nun austretende Blut konnte direkt in silikonisierte Gläschen fließen, in die zuvor soviel Natrium-Citrat-Lösung gegeben war, damit eine Endkonzentration von 3,8% erreicht wurde. Nachdem ein Gläschen gefüllt war, wurde es mit Parafilm (Parafilm "M", American CAN Company, MARATHON PRODUCTS, Neenah, Wisconsin) verschlossen und durch wiederholtes Kippen die Citrat-Lösung gleichmäßig verteilt.

Plättchenreiches Plasma (PRP)

Das plättchenreiche Plasma wurde nach der von BORN (9) beschriebenen Methode hergestellt. Hiernach erhält man durch 20 min dauerndes Zentrifugieren des Blutes bei 500 g als Überstand plättchenreiches Plasma. Nachdem das PRP in ein anderes Gläschen überpipettiert war, wurde es vorsichtig gekippt und anschließend in zwei Proben zu je 5 ml aufgeteilt.

Plättchenfreies Plasma (PFP)

Nach 20 min langem Zentrifugieren des PRP bei einer g-Zahl von 2 000 konnten im überstehenden Plasma mikroskopisch keine Thrombozyten mehr nachgewiesen werden.

Meßgerät

Die Extinktionsmessungen wurden mit einem EPPENDORF-Photometer 1100 durchgeführt. Für sämtliche Messungen wurden Küvetten von 1 cm Durchmesser, eine 7 x 12 Blende und der Filter EPPENDORF 578 benutzt.

Extinktionsmessung und Aussage des Extinktionswertes

Die Plättchenaggregation wurde mit Ausnahme der später zu besprechenden Abweichung nach der BORN-Methode gemessen (9). Die Eichung des Photometers erfolgte dergestalt, daß die optische Dichte von aqua dest. als 0-Extinktion und die bei geschlossenem Strahlengang als Unendlich-Extinktion gewählt wurde. Die Extinktionen der beiden PRP-Proben, die exakt übereinstimmen müssen, sind die Ausgangswerte der Messungen. Die auf diese Weise erhaltene Extinktion, vermindert um den Betrag des zugehörigen plättchenfreien Plasmas (E_{PPF}), läßt - im nicht aggregierten Zustand der Thrombozyten - eine Aussage über deren Zahl zu. Dieser Differenzwert ($E_{PRP} - E_{PPF}$) ist der Zahl der Thrombozyten direkt proportional (BORN). Nach Zugabe einer plättchenaggregierenden Substanz kann das Ausmaß der Aggregation quantitativ verfolgt werden. Zunehmende Aggregation bewirkt eine Abnahme der Extinktion. Desaggregation der Thrombozyten gibt sich an einem Anstieg der Extinktion zu erkennen.

Versuchsanordnung

Nach der von BORN beschriebenen Originalmethode werden die Substanzen, die in das Plasma gegeben werden, durch Rotation eines Stäbchens im Plasma verteilt (stirring). Die hierbei verwendeten Umdrehungszahlen von 1 000/min schaffen rheologische Verhältnisse, die in dieser Art in vivo nicht vorkommen. Darüberhinaus werden die Thrombozyten einer mechanischen Belastung ausgesetzt, die groß genug ist, um einen Teil der Plättchen zu zerstören (8). Diese Zerstörung aber ist, infolge des ATP- und ADP-Gehaltes der Thrombozyten, selbst ein aggregationsauslösender Faktor. Das Studium aggregierend und desaggregierend wirkender Substanzen wird dadurch erschwert.

In den hier zu besprechenden Versuchen wurde das Rühren durch Kippen der Gläschen bzw. der Küvetten ersetzt. Unmittelbar nachdem die Substanzen in das PRP pipettiert waren, wurden die Gläschen mit Parafilm verschlossen und genau 20 mal gekippt. Diese Zahl hatte sich nach entsprechenden Vorversuchen als ausreichend erwiesen. Die Extinktionen wurden in einminütigen Abständen gemessen, beginnend 60 sec nach Substanzzugabe. 15 sec vor jeder folgenden Ablesung wurde die Küvette dem Halter entnommen, mit Parafilm verschlossen und 5 mal gekippt. So konnte bei ausreichender Durchmischung des Plasmas eine Zerstörung der Thrombozyten und der gebildeten Aggregate vermieden werden.

Parallel zu jedem Testplasma wurde ein Vergleichsplasma mitgeführt. Diesem wurde anstelle der Testsubstanz ein gleiches Volumen physiologischer NaCl zugegeben. Wirkungen der geprüften Substanz sind dem Vergleich der Extinktionswerte der beiden Proben zu entnehmen.

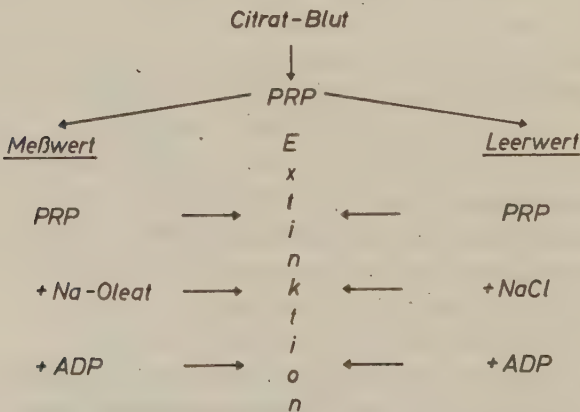


Abb. 1 Schema des Ablaufes der Hauptversuche. Erläuterungen s. Text.

Abb. 1 soll die für die Hauptversuche benutzte Versuchsanordnung darstellen. Die unter Hauptversuch 1.) besprochenen Experimente endeten bereits vor der hier eingezeichneten ADP-Zugabe, während für Hauptversuch 2.) das gesamte Schema gilt. Letzterer war 10 min nach ADP-Zugabe beendet.

D: Ergebnisse

Vorversuche

1.) Ausmaß der bei der Lipolyse während des Ablaufs der Versuche freiwerdenden unveresterten Fettsäuren

Bei Stehen von Blut oder Plasma, besonders bei 37° C, aber auch bei Zimmertemperatur, steigt die Konzentration der unveresterten Fettsäuren (UFS) im Plasma an. Es mußte demnach verhindert werden, daß die durch die Lipolyse freiwerdenden Fettsäuren für sich schon eine Veränderung der Aggregations-tendenz der Thrombozyten bewirken und die Versuchsergebnisse beeinflussen. Zur Klärung dieses Zusammenhangs wurden die Konzentrationen der UFS 9 verschiedener Plasmaproben zur Zeit des Versuchsbeginns und 20 min danach bestimmt. Es wurde die Methode von DOLE und MEINERTZ (22) in einer Modifikation nach KONITZER (42) benutzt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle I zusammengefaßt.

Tab. I UFS-Konzentrationen 9 verschiedener Plasmen in mg%, gemessen im Abstand von 20 min; Stehen bei Zimmertemperatur.

<u>Plasma</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>	<u>IX</u>
0 min	21,0	14,8	15,4	19,0	11,8	18,8	18,8	20,0	20,5
20 min	21,0	15,4	17,8	20,0	12,5	19,8	18,8	21,8	20,8

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, verändern sich bei 2 der untersuchten 9 Plasmen die Konzentrationen der UFS nicht. Die Konzentrationen der restlichen 7 Proben stiegen nur wenig an. Der Mittelwert des Anstieges aller 9 Plasmen nach 20 min langem Stehen bei Zimmertemperatur betrug 0,86 mg%.

Dieser Anstieg ist im Verhältnis zur Gesamtkonzentration der UFS und im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten zu-

sätzlichen Konzentrationen (10-160 mg%) gering. Da die Wirkung der lipolysebedingten Zunahme der UFS-Konzentration gegenüber dem Zusatz von Natrium-Oleat zu vernachlässigen war, haben wir auf die Anwendung spezifischer Lipase-Hemmer verzichtet.

2.) Ausschluß von Extinktionsveränderungen im plättchenfreien Plasma nach Natrium-Oleat-Zusatz

Das Prinzip der BORN'schen Methode zur quantitativen Erfassung der Plättchenaggregation beruht auf der Messung der optischen Dichte des zu untersuchenden Plasmas. Es mußten daher Veränderungen der optischen Dichte, die eine Aggregation bzw. Desaggregation nur vortäuschen, ausgeschlossen werden. Aus diesem Grunde wurden für jede der Natrium-Oleat-Konzentrationen 10, 20, 40, 80 und 160 mg% je 5 verschiedene plättchenfreie Plasmen wie folgt untersucht: zunächst wurden die Anfangsextinktionen der einzelnen Plasmen bestimmt. Nachdem die Oleat-Lösung in das PFP pipettiert und durch mehrmaliges Kippen der Küvetten gleichmäßig verteilt war, wurde über eine Dauer von 10 min die Extinktion des Plasma-Natrium-Oleat-Gemisches verfolgt. Bei keiner der obengenannten Konzentrationen konnten Änderungen der optischen Dichte festgestellt werden. Hieraus ist zu folgern, daß Extinktionsveränderungen nach Natrium-Oleat-Zusatz zu plättchenreichem Plasma ausschließlich auf Änderungen des Aggregationszustandes der Thrombozyten zurückzuführen sind.

3.) Fehlerbreite der Messungen

Die Genauigkeit der Extinktionsmessung für die in dieser Arbeit verwendeten Methode wurde überprüft, indem je 2 Proben desselben plättchenreichen Plasmas den Versuchsbe-

dingungen unterworfen wurden, die auch den Hauptversuchen zugrunde lagen. Es wurde lediglich auf den Natrium-Oleat- bzw. NaCl-Zusatz verzichtet. Aus den Differenzen korrespondierender Extinktionswerte wurde die Abweichung in % errechnet. Der 100%-Wert wurde für jedes Plasma neu ermittelt. Er ergibt sich aus der Subtraktion des Extinktionswertes des plättchenfreien Plasmas vom Extinktionswert des zugehörigen plättchenreichen Plasmas ($E_{PRP} - E_{FP}$).

Die Berechnung des arithmetischen Mittels der Meßwertdifferenzen für die 12 untersuchten Plasmen ergab einen Wert von 0,69%. Die größte gemessene Abweichung (Differenz) betrug 2,63%, die kleinste betrug 0,0%.

Hauptversuche

1.) Einfluß des Natrium-Oleats auf die Aggregation der Thrombozyten in plättchenreichem Plasma

An insgesamt 40 verschiedenen plättchenreichen Plasmen wurde die Wirkung des Natrium-Oleats auf die Aggregation der Plättchen untersucht. Für jede der 5 Natrium-Oleat-Konzentrationen 10, 20, 40, 80 und 160 mg% standen demnach 8 Plasmen zur Verfügung.

Die Beobachtungsdauer war auf 5 Minuten abgegrenzt worden. Da alle bekannten, aggregierend wirkenden Substanzen (z.B. ADP, Thrombin, Adrenalin, 5-Hydroxytryptamin etc.) nach Zusatz zum F.P. innerhalb von Sekunden die Zusammenlagerung der Thrombozyten bewirken, kann nach einer Meßdauer von 5 Minuten mit großer Sicherheit eine Aussage darüber gemacht werden, ob die geprüfte Substanz mit der hier verwendeten Methode erfassbare aggregierende Eigenschaften besitzt oder nicht besitzt.

Parallel zu jedem Meßwert wurde ein NaCl-Kontrollversuch

mitgeführt. So konnte der Einfluß des Natrium-Oleats auf die Aggregation der Blutplättchen unmittelbar dem Vergleich des Extinktionsverlaufes der beiden Versuche entnommen werden. Dabei zeigte sich, daß bei keiner der zugesetzten Natrium-Oleat-Konzentrationen Extinktionsunterschiede zu den korrespondierenden NaCl-Kontrollversuchen auftraten. Gelegentlich konnten geringfügige Abnahmen der optischen Dichte beobachtet werden. Die größte beobachtete Abnahme betrug 0,02 Einheiten der Extinktionsskala. Diese Abnahme der Extinktion betraf jedoch stets die beiden zusammengehörigen Plasmaproben - mit und ohne Oleat-Zusatz - gemeinsam. Es kann sich daher nicht um eine spezifische Wirkung des Natrium-Oleats gehandelt haben. Die Ursache war wahrscheinlich die sog. "Spontanaggregation" der Thrombozyten, ein Vorgang, der während des Stehens des PRP bei 37° C beschleunigt abläuft und bei Zimmertemperatur meist nur über größere Zeitabstände erfaßt werden kann.

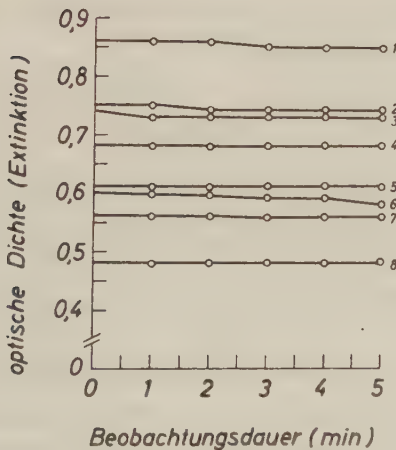


Abb. 2

Die Wirkung von Natrium-Oleat (20 mg%) auf die Aggregation der Thrombozyten in PRP; die Extinktionskurven der NaCl-Kontrollversuche verlaufen deckungsgleich mit den eingezeichneten Kurven; die Ziffern 1-8 bezeichnen die verschiedenen Plasmen.

Die Abb. 2 zeigt den Extinktionsverlauf 8 verschiedener plättchenreicher Plasmen nach Natrium-Oleat-Zusatz in einer Konzentration von 20 mg%. Wie in allen folgenden Abbildungen und Tabellen sind auch hier die Extinktionswerte der einzelnen Plasmen um den Betrag der Extinktion ihres PFP vermindert. Die unterschiedliche Höhe der Kurven hat nichts mit dem Aggregationszustand der Thrombozyten zu tun. Sie ist vielmehr Ausdruck der in den Plasmen enthaltenen Anzahl von Blutplättchen, die von Fall zu Fall differieren kann. Die Konzentrationen 10, 40, 80 und 160 mg% Natrium-Oleat ergaben ebenfalls keine Extinktionsunterschiede gegenüber den entsprechenden NaCl-Kontrollversuchen.

Eine Aggregation der Thrombozyten nach Zusatz von Natrium-Oleat in den Konzentrationen 10, 20, 40, 80 und 160 mg% zu plättchenreichem Plasma konnte demnach mit der BORN'schen Methode in keinem der geprüften 40 Fälle nachgewiesen werden.

2.) Einfluß verschiedener Natrium-Oleat-Konzentrationen auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation

Wie dem Kapitel "Zum Mechanismus der Thrombozytenaggregation" zu entnehmen ist, können mit kleinsten Mengen ADP Plättchen zu einer reversiblen Zusammenlagerung gebracht werden. Dies ermöglicht das Studium des Einflusses verschiedener Substanzen auf den Vorgang und das Ausmaß der Aggregation und gegebenenfalls einer Desaggregation der Blutplättchen. Wirkungen der zugesetzten Substanz auf den Ablauf der Aggregation und auf die Größe der entstandenen Aggregate sind wiederum aus dem Vergleich mit dem zugehörigen Kontrollversuch ersichtlich.

Für jede der Natrium-Oleat-Konzentrationen 10, 20, 40, 80 und 160 mg% wurden 8 Plasmen untersucht. Die ADP-Lösung wurde 5 Minuten nach dem Oleat- bzw. NaCl-Zusatz in das plättchen-

reiche Plasma pipettiert. Es war dabei prinzipiell unerheblich, ob zunächst ADP und dann Natrium-Oleat dem PRP zugesetzt, oder ob umgekehrt vorgegangen wurde.

Während des Kippens bildeten sich im anfänglich homogen trüben Plasma zunächst kleine, mit bloßem Auge eben sichtbare Flocken. Diese aus zusammengelagerten Thrombozyten bestehenden Klümpchen nahmen innerhalb weniger Sekunden an Größe zu und ergaben ein Bild, das in der Literatur als "Schneesturm" (snow-storm) bezeichnet wird. Gleichzeitig mit dem Auftreten der Thrombozytenaggregate sank die optische Dichte des Plasmas rapide ab. Der Extinktionsabfall war stets innerhalb der ersten beiden Minuten nach ADP-Zugabe am ausgeprägtesten. Während der folgenden 2-3 Minuten zeigte das Photometer nur noch eine geringe Abnahme der optischen Dichte an. Der weitere Verlauf des Extinktionsverhaltens wies zwischen den einzelnen Plasmen beträchtliche Unterschiede auf. Bei einem Teil der Versuche blieb die optische Dichte der Plasmen von der 5. bis zur 10. Minute nach ADP-Zusatz konstant. Bei einem anderen Teil sank die Extinktion, wenn auch geringfügig, ab. Eine dritte Gruppe ließ einen Anstieg der Extinktion erkennen. Dieser unterschiedliche Verlauf der Extinktionskurven kann nur mit individuellen Eigenschaften der einzelnen Plasmen erklärt werden. Offensichtlich besitzen einige Plasmen die mehr oder weniger ausgeprägte Fähigkeit der spontanen Desaggregation bereits gebildeter Thrombozytenaggregate. Der absoluten Zahl der in den Plasmen enthaltenen Plättchen scheint dabei keine Bedeutung zuzukommen.

Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wurde ganz auf die Darstellung der Extinktionsdifferenzen, die sich zwischen Meßwer-

ten und Kontrollwerten ergaben, ausgerichtet. Die Kinetik der Aggregation (Steilheit des Extinktionsabfalles) wurde nicht berücksichtigt, da unseres Erachtens die Beurteilung der Größe und Zahl der in einer bestimmten Zeit nach ADP-Zugabe gebildeten Aggregate von größerem Interesse ist als die Geschwindigkeit, mit der diese entstehen.

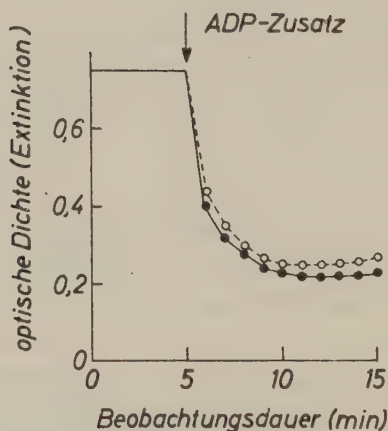


Abb. 3 Änderung der Extinktion eines PRP nach ADP-Zusatz ($2 \times 10^{-6} \text{ M/L}$);
(o-o-o) = PRP mit Natrium-Oleat in einer Konzentration von 20mg%;
(●-●-●) = PRP mit NaCl anstelle von Na-Oleat als Kontrollwert; Na-Oleat bzw. NaCl wurden zur Zeit 0 einpipetiert, ADP 5 min später.

Zunächst sei am Beispiel eines Einzelversuches der typische Verlauf der Extinktion eines plättchenreichen Plasmas nach ADP-Zusatz demonstriert (s. Abb. 3). So wie in dieser Abbildung wurden für jede Natrium-Oleat-Konzentration (10, 20,

40, 80 und 160 mg%) jeweils 8 Kurvenpaare erhalten. In Abb. 4 sind am Beispiel der 8 Plasmen verschiedener Probanden die Kurvenverläufe der Extinktionen nach ADP-Zugabe bei einem Zusatz von 20 mg% Natrium-Oleat zu PRP aufgezeichnet. Hier ist die individuelle Streuung der Kurvenverläufe gut zu sehen. Aus Übersichtsgründen wurden hierbei die entsprechenden NaCl-Kontrollkurven nicht eingezeichnet, sie sind jedoch aus der Tabelle III und den daraus errechneten Mittelwertskurven ersichtlich.

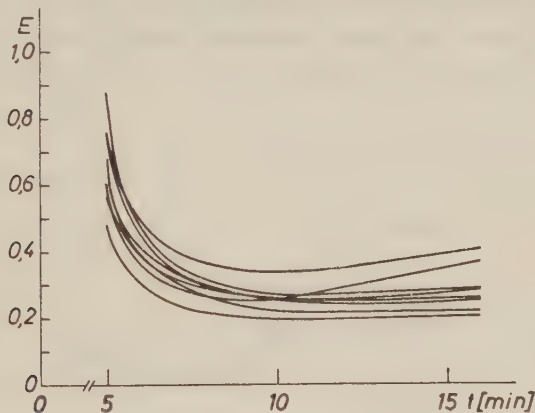


Abb. 4 Verlauf der optischen Dichte 8 verschiedener plättchenreicher Plasmen nach Zugabe von ADP (2×10^{-6} M/L). Zur Zeit $t=0$ wurde den Plasmen Natrium-Oleat in einer Endkonzentration von 20 mg% zugeführt. ADP wurde bei $t=5$ min einpipettiert.

Aus den tabellarischen Gegenüberstellungen der photometrischen Meßwerte der Testplasmen mit denen der Kontrollplasmen sind die Extinktions-(Aggregations) Unterschiede, die sich innerhalb der Versuchsreihen ergaben, klar ersichtlich (s. Tab. II-VI).

Die zusätzliche Natrium-Oleat-Konzentration von 10 mg% machte sich bei 6 der 8 Versuche dadurch bemerkbar, daß sie die Extinktion im Sinne einer Erhöhung beeinflusste, was einer geringeren Aggregation entspricht. Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen allerdings als gering bezeichnet werden (s. Tab. II). An den restlichen beiden Plasmen konnte keine deutliche Wirkung der geprüften Konzentration festgestellt werden. Eine aggregationsverstärkende Wirkung dieser Natrium-Oleat-Konzentration (10 mg%) wurde in keinem der 8 Fälle beobachtet. Die Mittelwertskurven des Extinktionsverlaufes lassen eine, wenn auch schwache, desaggregierende Wirkung dieser Natrium-Oleat-Konzentration erkennen (s. Abb. 5).

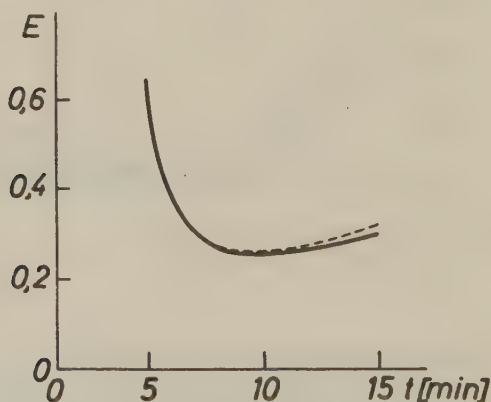


Abb. 5 Kurven der arithmetischen Mittel der Extinktionswerte 8 verschiedener PRP nach ADP-Zugabe (2×10^{-6} M/L).

(---) Plättchenreiche Plasmen mit Natrium-Oleat in einer Konzentration von 10 mg%;

(—) Vergleichsproben der gleichen Plasmen; diese enthalten NaCl anstelle von Natrium-Oleat. Natrium-Oleat bzw. NaCl wurden bei $t=0$ min einpipettiert; ADP bei $t=5$ min.

Auf die Erhöhung der Natrium-Oleat-Konzentration um 20 mg% reagierte die Hälfte der untersuchten Plasmen mit einer verminderten Aggregation der Thrombozyten nach ADP-Zusatz. Die optische Dichte der anderen Hälfte wurde nicht einheitlich beeinflusst. Die arithmetische Mittelwertskurve des Extinktionsverlaufes der 8 mit 20 mg% Natrium-Oleat versetzten plättchenreichen Plasmen nach ADP-Zugabe liegt höher als die Mittelwertskurve der Kontrollplasmen (s. Abb. 6). Das bedeutet, daß auch diese Konzentration zu einer Verminderung der Aggregationstendenz der Thrombozyten nach ADP-Zusatz befähigt ist.

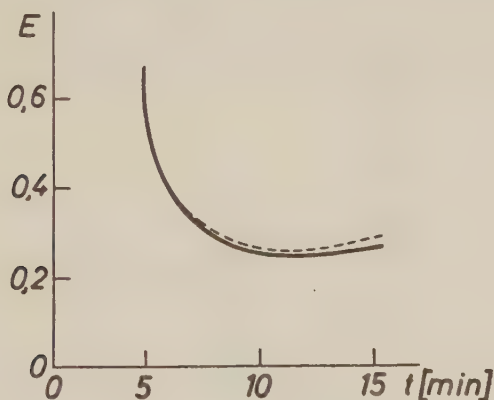


Abb. 6 Kurven der arithmetischen Mittel der Extinktionswerte 8 verschiedener PRP nach ADP-Zugabe (2×10^{-6} M/L).
(—) Plättchenreiche Plasmen mit Natrium-Oleat in einer Konzentration von 20 mg%;
(---) Vergleichsproben der gleichen Plasmen; diese enthalten NaCl anstelle von Natrium-Oleat. Natrium-Oleat bzw. NaCl wurden bei $t=0$ min einpipettiert; ADP bei $t=5$ min.

Der Zusatz von Natrium-Oleat, der eine Endkonzentration von 40 mg% ergab, erzielte keine einheitliche Reaktion. Der Tab. IV kann die unterschiedliche Beeinflussung der Aggregation durch diese Konzentration entnommen werden. Teils waren die Extinktionswerte der mit Natrium-Oleat versetzten Plasmen höher als die der Kontrollplasmen, teils wiesen letztere die größere optische Dichte auf. 1/3 der Vergleichswerte stimmten genau überein. Die Differenzen der korrespondierenden Mittelwerte der Extinktionen sind sehr klein. Die Kurven der arithmetischen Mittel der Extinktionen von Test- und Kontrollplasmen verlaufen daher annähernd deckungsgleich (s. Abb. 7). Eine deutliche Beeinflussung der Thrombozytenaggregation nach ADP-Zusatz durch Natrium-Oleat in einer Konzentration von 40 mg% konnte nicht nachgewiesen werden. In dieser Konzentration wird also die Plättchenaggregation nach ADP-Zusatz weder verstärkt noch vermindert.

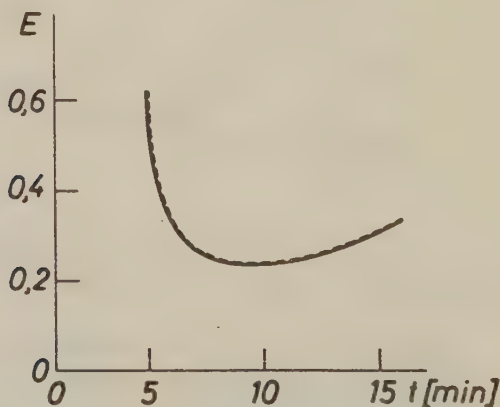


Abb. 7 Kurven der arithmetischen Mittel der Extinktionswerte 8 verschiedener PRP nach ADP-Zugabe (2×10^{-6} M/L).
(---) Plättchenreiche Plasmen mit Natrium-Oleat in einer Konzentration von 40 mg%;
(—) Vergleichsproben der gleichen Plasmen; diese enthalten NaCl anstelle von Natrium-Oleat. Natrium-Oleat bzw. NaCl wurden bei $t=0$ min einpipettiert; ADP bei $t=5$ min.

In der Konzentration von 80 mg% bewirkte das Natrium-Oleat eine gesteigerte Aggregationstendenz der Blutplättchen nach ADP-Zusatz. Eine verminderte Aggregation wurde in keinem der Fälle beobachtet. Die Abb. 8 zeigt die Kurven der arithmetischen Mittelwerte dieser Untersuchungsreihe. Aus Tab. V ist ersichtlich, daß die Kontrollplasmen bereits eine Minute nach ADP-Zusatz höhere Extinktionswerte aufwiesen als die mit Natrium-Oleat (80 mg%) versetzten Plasmen. Mit zunehmender Beobachtungsdauer vergrößerten sich die Differenzen der Extinktionswerte von Meß- und Kontrollplasmen. Entsprechend wird der Abstand der Mittelwertskurven weiter und die Verstärkung der ADP-induzierten Aggregation deutlicher.

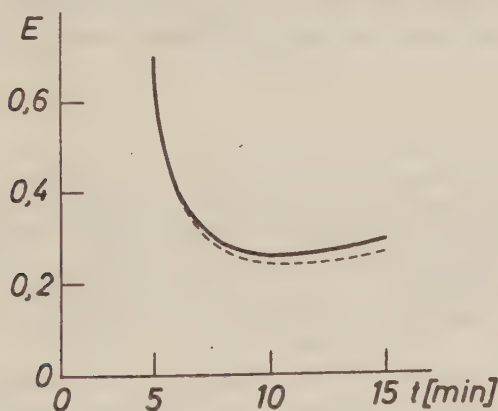


Abb. 8 Kurven der arithmetischen Mittel der Extinktionswerte 8 verschiedener PRP nach ADP-Zugabe (2×10^{-6} M/L).
(-- --) Plättchenreiche Plasmen mit Natrium-Oleat in einer Konzentration von 80 mg%;
(—) Vergleichsproben der gleichen Plasmen; diese enthalten NaCl anstelle von Natrium-Oleat. Natrium-Oleat bzw. NaCl wurden bei $t=0$ min einpipettiert; ADP bei $t=5$ min.

Bei der Prüfung der plättchenreichen Plasmen mit einer Natrium-Oleat-Konzentration von 160 mg% traten die letztgenannten Wirkungen noch ausgeprägter hervor (s. Tab. VI und Abb. 9). Übereinstimmend zeigten sämtliche plättchenreiche Plasmen eine deutlich vermehrte Aggregationsneigung der Thrombozyten nach ADP-Zusatz. Die Extinktionen der Testplasmen sanken im Vergleich zu ihren Kontrollen auf tiefere Werte und stiegen nach Einsetzen der spontanen Desaggregation langsamer an. Die Mittelwertskurven entfernen sich mit zunehmender Zeit wesentlich schneller voneinander als die der vorhergehenden Versuchsreihe. Der Zusatz von Natrium-Oleat in der Konzentration von 160 mg% zu plättchenreichem Plasma bewirkt demzufolge eine deutliche Steigerung der ADP-induzierten Aggregation der Thrombozyten und eine Verzögerung der spontan ablaufenden Spaltung der gebildeten Aggregate.

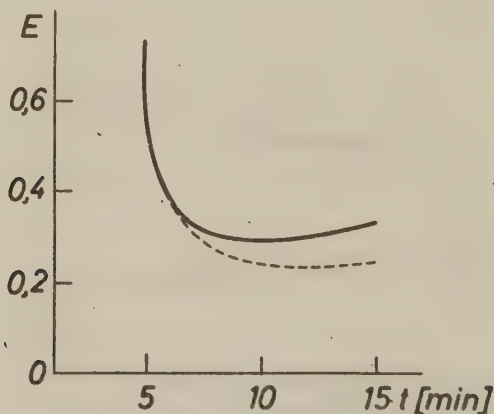


Abb. 9 Kurven der arithmetischen Mittel der Extinktionswerte 8 verschiedener PRP nach ADP-Zugabe (2×10^{-6} M/L).
(---) Plättchenreiche Plasmen mit Natrium-Oleat in einer Konzentration von 160 mg%;
(—) Vergleichsproben der gleichen Plasmen; diese enthalten NaCl anstelle von Natrium-Oleat. Natrium-Oleat bzw. NaCl wurden bei $t=0$ min einpipettiert; ADP bei $t=5$ min.

Zur Demonstration der unterschiedlichen Wirkung verschiedener Konzentrationen von Natrium-Oleat auf die ADP-induzierte Plättchenaggregation wurden in Abb. 10 und Tab. VII sich entsprechende Extinktionsdifferenzen dargestellt.

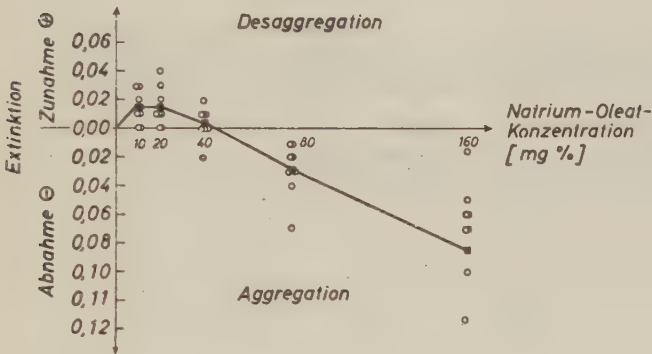


Abb. 10 Extinktionsdifferenzen zwischen Meß- (Natrium-Oleat) und Kontroll- (NaCl) Plasmen in Abhängigkeit von den geprüften Natrium-Oleat-Konzentrationen. Die schwarzen Quadrate geben die Mittelwerte der Extinktionsdifferenzen an. Ordinate: Unterschiede der optischen Dichte zwischen Meß- und Kontrollplasmen, gemessen in Einheiten der Extinktionsskala des benutzten Gerätes.

Als Bezugswerte für eine quantitative Beurteilung der Aggregationsbeeinflussung durch die verschiedenen Natrium-Oleat-Konzentrationen wurden die Extinktionszahlen gewählt, die 10 min nach ADP-Zusatz abgelesen wurden. In Tab. VII und Abb. 10 ist für jeden Versuch die Differenz eingetragen, die sich aus der Extinktion des Meßplasmas und der Extinktion des NaCl-Vergleichsplasmas ergibt. Positive Zahlen entsprechen einer verstärkten Trübung des mit Natrium-Oleat versetzten Plasmas und sind einer Aggregationsverminderung gleichzusetzen, negative Zahlen entsprechen einer Steigerung

der Aggregation bzw. Hemmung der Desaggregation. Die Größe der Zahlen macht eine Aussage über das Ausmaß der Beeinflussung. In der Abb. 10 sind neben den Einzelwerten auch die Mittelwerte der Extinktionsdifferenzen in Abhängigkeit von der zugesetzten Natrium-Oleat-Konzentration eingezeichnet.

Die statistische Signifikanz für die desaggregierende Wirkung von Natrium-Oleat in Konzentrationen von 10 und 20 mg% und die aggregierende Eigenschaft von Konzentrationen über 40 mg% ist aus der Abb. 10 deutlich ersichtlich. Eine weitergehende statistische Prüfung hatte sich deshalb erübrigt.

3.) Tabellarische Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Die folgenden Tabellen geben die Extinktionswerte der untersuchten thrombozytenreichen Plasmen nach ADP-Zugabe wieder.

Die Plasmen der Tabellen II-VI enthalten in gleicher Reihenfolge 10, 20, 40, 80 und 160 mg% Natrium-Oleat. Die Tabellen IIa-VIa geben die Extinktionswerte der zugehörigen NaCl-Vergleichsversuche wieder. Die eingetragenen Zahlen sind die Differenzen aus Meßwerten und zugehörigen PFP-Extinktionswerten.

Zeitangaben in min nach ADP-Zusatz.

Tab. II

10 mg% Natrium-Oleat

<u>PRP</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
0'	0,66	0,62	0,52	0,53	0,79	0,87	0,60	0,58
1'	0,35	0,35	0,36	0,35	0,57	0,47	0,37	0,36
2'	0,27	0,26	0,30	0,29	0,47	0,34	0,29	0,26
3'	0,22	0,24	0,28	0,26	0,44	0,32	0,24	0,22
4'	0,19	0,22	0,27	0,23	0,43	0,33	0,23	0,20
5'	0,19	0,22	0,28	0,23	0,43	0,34	0,23	0,20
6'	0,19	0,23	0,28	0,23	0,45	0,36	0,23	0,19
7'	0,20	0,23	0,31	0,23	0,46	0,40	0,22	0,20
8'	0,22	0,23	0,32	0,23	0,48	0,43	0,23	0,20
9'	0,22	0,24	0,34	0,24	0,50	0,47	0,23	0,21
10'	0,23	0,27	0,35	0,25	0,51	0,49	0,24	0,23

Tab. IIa

NaCl-Vergleichsplasmen zu 10 mg% Natrium-Oleat Meßplasmen

<u>PRP</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
0'	0,66	0,62	0,52	0,53	0,79	0,87	0,60	0,58
1'	0,34	0,35	0,36	0,36	0,55	0,44	0,38	0,37
2'	0,27	0,26	0,30	0,29	0,46	0,33	0,29	0,26
3'	0,21	0,23	0,28	0,26	0,43	0,31	0,25	0,23
4'	0,19	0,21	0,26	0,23	0,41	0,30	0,24	0,20
5'	0,19	0,21	0,27	0,23	0,42	0,31	0,23	0,20
6'	0,19	0,21	0,28	0,22	0,43	0,33	0,22	0,20
7'	0,19	0,21	0,29	0,22	0,45	0,35	0,22	0,20
8'	0,21	0,22	0,30	0,23	0,47	0,39	0,23	0,20
9'	0,21	0,23	0,31	0,24	0,49	0,43	0,23	0,20
10'	0,22	0,24	0,33	0,25	0,50	0,46	0,24	0,21

Tab. III

20 mg% Natrium-Oleat

<u>PRP</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
0'	0,68	0,57	0,61	0,61	0,88	0,75	0,48	0,76
1'	0,39	0,39	0,36	0,41	0,48	0,44	0,30	0,49
2'	0,31	0,32	0,29	0,34	0,36	0,34	0,25	0,40
3'	0,28	0,29	0,27	0,30	0,32	0,31	0,22	0,37
4'	0,24	0,28	0,26	0,28	0,29	0,27	0,20	0,35
5'	0,23	0,27	0,27	0,26	0,28	0,25	0,20	0,34
6'	0,22	0,26	0,28	0,25	0,27	0,25	0,19	0,34
7'	0,22	0,26	0,30	0,25	0,27	0,26	0,19	0,36
8'	0,22	0,27	0,31	0,25	0,28	0,25	0,20	0,37
9'	0,22	0,27	0,34	0,25	0,28	0,26	0,20	0,38
10'	0,22	0,28	0,35	0,26	0,28	0,27	0,21	0,39

Tab. IIIa

NaCl-Vergleichsplasmen zu 20 mg% Natrium-Oleat Meßplasmen

<u>PRP</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
0'	0,68	0,57	0,61	0,61	0,88	0,75	0,48	0,76
1'	0,39	0,39	0,38	0,41	0,49	0,40	0,30	0,47
2'	0,30	0,32	0,30	0,34	0,35	0,30	0,24	0,39
3'	0,26	0,29	0,27	0,30	0,32	0,28	0,20	0,35
4'	0,23	0,28	0,27	0,27	0,29	0,24	0,19	0,33
5'	0,22	0,27	0,27	0,25	0,28	0,23	0,17	0,33
6'	0,21	0,27	0,28	0,25	0,28	0,23	0,16	0,34
7'	0,20	0,27	0,31	0,24	0,26	0,22	0,17	0,34
8'	0,20	0,27	0,32	0,25	0,25	0,23	0,17	0,35
9'	0,21	0,27	0,33	0,25	0,27	0,23	0,17	0,36
10'	0,21	0,28	0,35	0,25	0,27	0,23	0,18	0,37

Tab. IV

40 mg% Natrium-Oleat

<u>PRP</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
0'	0,59	0,68	0,69	0,49	0,63	0,60	0,73	0,59
1'	0,32	0,35	0,39	0,23	0,39	0,32	0,40	0,36
2'	0,25	0,28	0,31	0,17	0,32	0,23	0,31	0,28
3'	0,23	0,26	0,28	0,14	0,29	0,21	0,30	0,25
4'	0,21	0,25	0,28	0,13	0,28	0,21	0,31	0,23
5'	0,21	0,26	0,28	0,12	0,29	0,20	0,34	0,22
6'	0,21	0,27	0,29	0,12	0,31	0,20	0,35	0,22
7'	0,22	0,29	0,30	0,12	0,32	0,21	0,38	0,21
8'	0,23	0,32	0,32	0,12	0,34	0,22	0,42	0,23
9'	0,25	0,33	0,34	0,12	0,36	0,23	0,44	0,24
10'	0,26	0,35	0,36	0,13	0,38	0,25	0,46	0,24

Tab. IVa

NaCl-Vergleichsplasmen zu 40 mg% Natrium-Oleat Meßplasmen

<u>PRP</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
0'	0,59	0,68	0,69	0,49	0,63	0,60	0,73	0,59
1'	0,32	0,35	0,38	0,24	0,38	0,30	0,37	0,36
2'	0,25	0,27	0,29	0,17	0,30	0,22	0,30	0,27
3'	0,23	0,25	0,29	0,14	0,27	0,21	0,29	0,24
4'	0,20	0,25	0,29	0,13	0,28	0,20	0,29	0,23
5'	0,21	0,26	0,28	0,13	0,30	0,21	0,31	0,21
6'	0,21	0,26	0,30	0,12	0,31	0,21	0,34	0,21
7'	0,21	0,28	0,32	0,12	0,33	0,21	0,37	0,22
8'	0,23	0,30	0,34	0,12	0,35	0,22	0,40	0,23
9'	0,21	0,31	0,36	0,11	0,37	0,23	0,42	0,23
10'	0,23	0,34	0,38	0,11	0,38	0,25	0,45	0,24

Tab. V

80 mg% Natrium-Oleat

<u>PRP</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
0'	0,76	0,57	0,84	0,78	0,61	0,51	0,68	0,88
1'	0,38	0,32	0,48	0,46	0,34	0,30	0,41	0,52
2'	0,29	0,24	0,35	0,35	0,25	0,24	0,33	0,40
3'	0,25	0,21	0,31	0,31	0,23	0,22	0,30	0,37
4'	0,23	0,19	0,28	0,28	0,22	0,19	0,27	0,33
5'	0,22	0,18	0,27	0,27	0,24	0,18	0,28	0,29
6'	0,22	0,18	0,27	0,27	0,24	0,18	0,28	0,29
7'	0,23	0,18	0,28	0,27	0,25	0,18	0,30	0,29
8'	0,23	0,18	0,30	0,28	0,26	0,18	0,32	0,29
9'	0,24	0,18	0,31	0,28	0,28	0,19	0,34	0,29
10'	0,24	0,18	0,31	0,29	0,29	0,19	0,35	0,28

Tab. Va

NaCl-Vergleichsplasmen zu 80 mg% Natrium-Oleat Meßplasmen

<u>PRP</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
0'	0,76	0,57	0,84	0,78	0,61	0,51	0,68	0,88
1'	0,43	0,33	0,48	0,48	0,35	0,31	0,43	0,54
2'	0,32	0,26	0,35	0,39	0,26	0,24	0,34	0,42
3'	0,28	0,22	0,32	0,35	0,25	0,22	0,31	0,37
4'	0,26	0,21	0,29	0,33	0,24	0,20	0,30	0,35
5'	0,25	0,20	0,30	0,30	0,24	0,19	0,31	0,32
6'	0,24	0,19	0,30	0,31	0,25	0,19	0,33	0,31
7'	0,24	0,20	0,30	0,31	0,26	0,20	0,34	0,30
8'	0,26	0,20	0,31	0,31	0,28	0,20	0,37	0,30
9'	0,27	0,20	0,31	0,31	0,31	0,21	0,40	0,30
10'	0,28	0,21	0,32	0,31	0,22	0,21	0,42	0,29

Tab. VI

160 mg% Natrium-Oleat

<u>PRP</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
0'	0,76	0,81	0,68	0,84	0,85	0,77	0,61	0,57
1'	0,40	0,34	0,36	0,41	0,49	0,41	0,38	0,36
2'	0,30	0,26	0,27	0,33	0,36	0,32	0,31	0,30
3'	0,27	0,23	0,23	0,28	0,33	0,30	0,27	0,26
4'	0,23	0,22	0,22	0,26	0,30	0,29	0,25	0,24
5'	0,22	0,21	0,22	0,25	0,29	0,28	0,23	0,23
6'	0,21	0,22	0,21	0,23	0,28	0,27	0,24	0,23
7'	0,21	0,23	0,22	0,23	0,29	0,26	0,24	0,23
8'	0,20	0,24	0,23	0,23	0,30	0,26	0,23	0,22
9'	0,19	0,25	0,24	0,24	0,30	0,26	0,23	0,22
10'	0,19	0,26	0,25	0,25	0,31	0,26	0,23	0,23

Tab. VIa

NaCl-Vergleichsplasmen zu 160 mg% Natrium-Oleat Meßplasmen

<u>PRP</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
0'	0,76	0,81	0,68	0,84	0,85	0,77	0,61	0,57
1'	0,40	0,36	0,36	0,41	0,46	0,42	0,41	0,42
2'	0,30	0,29	0,27	0,35	0,37	0,36	0,34	0,36
3'	0,28	0,27	0,24	0,31	0,37	0,34	0,31	0,34
4'	0,27	0,26	0,24	0,32	0,35	0,34	0,29	0,32
5'	0,25	0,29	0,24	0,32	0,35	0,33	0,28	0,30
6'	0,24	0,30	0,25	0,33	0,35	0,33	0,28	0,30
7'	0,24	0,33	0,26	0,34	0,36	0,33	0,28	0,29
8'	0,23	0,36	0,28	0,35	0,37	0,33	0,28	0,29
9'	0,25	0,39	0,29	0,36	0,39	0,33	0,29	0,29
10'	0,25	0,41	0,30	0,37	0,41	0,33	0,29	0,30

Tab. VII

Extinktionsdifferenzen 10 min nach Zusatz von ADP

Die eingetragenen Zahlen wurden durch Subtraktion der Leerwert-Extinktion (E_{NaCl}) von der Meßwert-Extinktion ($E_{\text{Natrium-Oleat}}$) erhalten. (S. Text zu Abb. 10)

Na-Ol. Konzentr.	<u>P R P</u>							
	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>	<u>VIII</u>
10 mg%	0,01	0,03	0,02	0,00	0,01	0,03	0,00	0,02
20 mg%	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,04	0,03	0,02
40 mg%	0,01	0,01	-0,02	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00
80 mg%	-0,04	-0,03	-0,01	-0,02	-0,03	-0,02	-0,07	-0,01
160 mg%	-0,06	-0,015	-0,05	-0,12	-0,10	-0,07	-0,06	-0,07

E: Diskussion

Es liegen zahlreiche Untersuchungen über den Einfluß von un-
veresterten Fettsäuren auf die Aggregation der Thrombozyten
vor. Bezüglich der aggregierenden Eigenschaften der verschie-
denen Fettsäuren wurden erhebliche Unterschiede gefunden; so
werden häufig den langkettigen, gesättigten Fettsäuren aggre-
gierende Fähigkeiten zugeschrieben, während die Ergebnisse aus
Untersuchungen mit langkettigen, ungesättigten Fettsäuren von-
einander abweichen. Da die Ölsäure an den im Plasma vorkom-
menden ungesättigten Fettsäuren den höchsten Anteil hat (40),
kommt besonders dieser Fettsäure spezielles Interesse zu. Aus
den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, daß die
Ölsäure, untersucht in Form ihres Natrium-Salzes, nach Zusatz
physiologisch denkbarer Konzentrationen im Plasma keine throm-
bozytenaggregierende Eigenschaften besitzt, sondern in Konzen-
trationen bis 40 mg% eine teilweise Desaggregation von Plätt-
chenaggregaten bewirkt (s. Abb. 10). Erst extrem hohe Konzen-
trationen von Natrium-Oleat (160 mg%) zeigen nach Zusatz zu
plättchenreichem Plasma mikroskopisch kleine Thrombozytenag-
gregate.

Verschiedene Autoren berichten jedoch über thrombogene Wir-
kungen des Natrium-Oleats und beschreiben generell eine blut-
plättchenaggregierende Fähigkeit dieser Substanz (35, 36, 43).
Vergleicht man unsere Untersuchungen mit den zitierten Arbei-
ten über den Einfluß von Natrium-Oleat auf die Plättchenaggre-
gation genauer, so fallen mehrere methodische Verschiedenhei-
ten auf, die möglicherweise eine Erklärung für die differen-
ten Resultate geben. Einige Autoren fanden, daß Natrium-Oleat
sowohl auf gewaschene Thrombozyten (36, 43) als auch auf
Thrombozyten in plättchenreichem Plasma (36) im Sinne einer
Aggregatbildung wirkt. Physiologische Konzentrationen aggre-
gierten dabei lediglich gewaschene Thrombozyten, nicht aber

Blutplättchen in plättchenreichem Plasma. Diese Thrombozyten konnten nur durch unphysiologisch hohe Konzentrationen zu einer ausschließlich mikroskopisch nachweisbaren Aggregation gebracht werden. Wahrscheinlich ist die Anwesenheit des Plasma-Albumins bei diesen in vitro-Untersuchungen von entscheidender Bedeutung. Die unveresterten Fettsäuren des Plasmas liegen in vivo nicht frei vor, sondern sind an Albumin gebunden (28). Wird Natrium-Oleat dem Plasma zugesetzt, so wird dieses an Albumin gebunden, wobei diese Bindung besonders schnell erfolgt (28, 36). Freie Ölsäure (im Sinne von nicht an Albumin gebundener) kommt in vivo praktisch nicht vor. Untersuchungen mit gewaschenen Plättchen ergeben demnach ein Bild, das nicht geeignet ist, Rückschlüsse auf in vivo-Verhältnisse zuzulassen.

HOAK et al. beschrieben das Auftreten von Thromben in den Lungen von Versuchstieren nach i. v. Injektion von Albumin-Lösungen, die hohe Konzentrationen an Natrium-Oleat enthielten. Möglicherweise war nicht alles applizierte Natrium-Oleat an Albumin effektiv gebunden. Andere Untersuchungen der gleichen Verfasser zeigen nämlich, daß die aggregierenden Wirkungen des Natrium-Oleats auf gewaschene Thrombozyten durch vorherigen Zusatz von Albumin nahezu aufgehoben werden können (36). In-vivo-Versuche wie die von HOAK et al. sind mit einer Fülle von möglichen Begleiterscheinungen behaftet wie z.B. Beeinflussung der Blutgerinnung, Venenwandirritation infolge plötzlicher Erhöhung der Fettsäurekonzentrationen, Beeinträchtigung anderer Blutzellen infolge der Oberflächenaktivität der infundierten Lösung etc. Außerdem bietet die einmalige Injektion hochkonzentrierter Natrium-Oleat-Lösungen in die Vene keine geeignete Vergleichsmöglichkeit zu den Vorgängen, die sich bei der Erhöhung der Konzentration der unveresterten Fettsäuren intravital abspielen. Dieser Anstieg erfolgt bekannterweise langsam und über das gesamte Blutvolumen verteilt, so z.B. bei stress-Situationen, beim Rauchen, während des Hungerns etc. Auch nach

der therapeutischen Anwendung von Heparin kommt es zu einem derartigen langsamen Anstieg der unveresterten Fettsäuren.

Unter ähnlichem Vorbehalt sind die Ergebnisse von ZBINDEN (59) und DAY (20) zu beurteilen, die nach Natrium-Oleat-Infusionen bei Tieren eine Thrombopenie beobachteten.

Die Ergebnisse von ARDLIE et al. (1) stimmen in gewissem Umfange mit denen der vorliegenden Arbeit überein. Unter nahezu gleichen Bedingungen konnte ARDLIE weder eine aggregierende Wirkung des Natrium-Oleats in plättchenreichem Plasma feststellen, noch eine Beeinflussung der ADP-induzierten Aggregation der Blutplättchen. Allerdings lagen die von ARDLIE verwendeten Konzentrationen unter den von uns untersuchten Oleat-Mengen.

Die Methode der vorliegenden Arbeit wurde so gewählt, daß störende Faktoren weitgehend eliminiert wurden und die Aggregation unter möglichst physiologischen und standardisierten Bedingungen gemessen werden konnte. Aus entsprechenden Vorversuchen wurde die Fehlerbreite der Messungen als sehr gering ermittelt. Eine Änderung der Extinktion des Plasmas durch das Natrium-Oleat selbst, d.h. ohne die Thrombozytenaggregation zu beeinflussen, konnte an Hand eines weiteren Vorversuches ausgeschlossen werden.

Auf das in der Originalvorschrift von BORN (9) angegebene Rühren des Plasmas (stirring) wurde bewußt verzichtet, um dadurch die Zerstörung von Thrombozyten und das Aufspalten von Aggregaten durch starke mechanische Kräfte zu vermeiden. Das Sedimentieren der aggregierten Thrombozyten konnte durch mehrmaliges Kippen der Küvetten in kurzen Zeitabständen verhindert werden. In einer nach Beendigung dieser Arbeit erschienenen Publikation von GROSS und Mitarbeiter (31) wurde ebenfalls darauf geachtet, mechanische Momente, welche die Aggregation beeinflussen könnten, zu vermeiden.

Da bekannt war, daß die Erwärmung des Plasmas auf 37° C mit einer gesteigerten Spontanaggregation verbunden ist und die Plättchen bei Raumtemperatur die geringsten Veränderungen ihrer Form und ihres Volumens aufweisen (44), wurden die Versuche bei Zimmertemperatur durchgeführt. Diese Temperatur hat darüberhinaus den Vorteil, die spontane Desaggregation zu verlangsamen, während bei 37° C die gebildeten Aggregate innerhalb weniger Minuten zum Teil wieder aufgespalten werden.

Die Wirkung von Natrium-Oleat auf die Thrombozytenaggregation wurde in Konzentrationen von 10, 20, 40, 80 und 160 mg% bezogen auf Plasma untersucht. Damit wurde der physiologisch mögliche Bereich (10-40 mg%) erfaßt und darüber hinaus Konzentrationen, die in dieser Höhe in vivo nicht vorkommen (80-160 mg%).

An Hand von orientierenden mikroskopischen Untersuchungen (Phasenkontrastmikroskop) konnte festgestellt werden, daß analog der fehlenden Extinktionsveränderung auch mikroskopisch in plättchenreichen Plasmen mit Natrium-Oleat-Zusatz bis 80 mg% keine Thrombozytenaggregation nachzuweisen war. Die mikroskopische Untersuchung von plättchenreichem Plasma nach Zusatz von 160 mg% Natrium-Oleat ergab, daß Natrium-Oleat in dieser Konzentration nicht nur aggregationsverstärkend nach ADP-Zugabe wirkt, sondern auch unmittelbar aggregierende Eigenschaften besitzt. Die Plättchen lagerten sich bei dieser hohen Konzentration zu Aggregaten von ca. einfachem Erythrozytendurchmesser zusammen. Es handelte sich also um kleine Aggregate, die die optische Dichte des Plasmas noch nicht beeinflussten und somit photometrisch nicht erfaßt werden konnten. Konzentrationen von unveresterten Fettsäuren über 80 mg% kommen in vivo praktisch nicht vor, so daß der aggregierenden und aggregationsverstärkenden Wirkung hoher Natrium-Oleat-Konzentrationen keine Bedeutung beizumessen ist.

Die nachgewiesene desaggregierende Wirkung von Natrium-Oleat in Konzentrationen bis 40 mg% auf ADP-induzierte Thrombozytenaggregate zeigt eine auffallende Parallelität zu der von EHRLY und MÜLLER beschriebenen desaggregierenden Wirkung von Natrium-Oleat auf Erythrozytenaggregate (27). Während für Erythrozyten bei höheren Konzentrationen die desaggregierende Wirkung zunimmt, ist dies bei Thrombozyten nicht der Fall (s. Abb. 10). Bei Erythrozyten wurde der Mechanismus der Desaggregation mit einer auftretenden Veränderung der Erythrozyten über bikonvexe und Stechapfelformen zu Sphärozyten erklärt. Es wurde angenommen, daß sich die nach Zusatz von 40 mg% Natrium-Oleat zu Blut vorwiegend bikonvexen Erythrozyten rein mechanisch aufgrund ihrer - gegenüber der normalen Form - geringeren Anlagefläche nicht so leicht zu Aggregaten zusammenlagern können. Es lag deshalb nahe, den beschriebenen desaggregierenden Effekt geringer Konzentrationen von Natrium-Oleat auf Thrombozytenaggregate in ähnlicher Weise zu erklären, zumal die notwendigen Konzentrationen im selben Bereich lagen.

An Hand von mikroskopischen Untersuchungen (Phasenkontrastmikroskop) konnten jedoch bei Konzentrationen bis 40 mg% keine sicheren Veränderungen der Thrombozytenform gefunden werden. Aus anderen, noch nicht publizierten Untersuchungen über den Einfluß und den Wirkungsmechanismus einiger spezifisch Thrombozytenaggregat-desaggregierender Substanzen wie z.B. Promethazin ist zu erkennen gewesen, daß hierbei eine um so stärkere Thrombozytendesaggregation möglich ist, je höher die gewählte Substanzkonzentration im plättchenreichen Plasma ist. Hier haben wir die gleichen Konzentrations-Wirkungs-Relationen finden können wie bei der Desaggregation von Erythrozytenaggregaten (26). Die mi-

kroskopische Untersuchung der desaggregierten Thrombozyten ergab bei höheren Konzentrationen von z.B. Promethazin eine Abrundung der Thrombozyten in Richtung auf Kugelformen (spheres), wie sie bereits von anderen Autoren beschrieben wurde (44, 49). Es ist anzunehmen, daß auch für Natrium-Oleat und seine geringgradige thrombozytendesaggregierende Wirkung ein ähnlicher Mechanismus vorliegt, wenngleich die Konzentrationen bis 40 mg% offenbar nur so geringe Formveränderungen an den Thrombozyten hervorrufen, daß sie mit unseren Mitteln nicht nachgewiesen werden konnten. Warum hohe Natrium-Oleat-Konzentrationen (80, 160 mg%) keine stärkere Desaggregation, sondern eine Steigerung der Aggregation von Thrombozyten bewirken, konnte nicht geklärt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen beschränken sich auf die Wirkung von Natrium-Oleat auf die Aggregation der Thrombozyten. Neben Natrium-Oleat, das in vivo eine der am häufigsten vorkommenden unveresterten Fettsäuren ist und das sich wegen seiner Wasserlöslichkeit gut handhaben läßt, existieren noch andere unveresterte Fettsäuren im Plasma, so z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure etc. Von diesen Fettsäuren wird eine aggregationsfördernde Wirkung beschrieben, wenngleich es auch möglich erscheint, daß bei entsprechend niedrigen Konzentrationen eine aggregierende Wirkung nicht vorliegt. Die physiologischen Konzentrationen der unveresterten Fettsäuren im Plasma sowie ihre Schwankungsbreite unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen liegen jedenfalls in dem Bereich, für den mit Natrium-Oleat eine desaggregierende Wirkung nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise ist auch die Minderung der Thrombozytenaggregation nach Heparin-Injektion und nach Verabreichung heparinähnlicher Substanzen (SP 54), wie sie von SLACK (57) und AZNAR (2) beschrieben wurde, auf eine Erhöhung der Konzentration der unveresterten

Fettsäuren zurückzuführen, zumal bekannt ist, daß nach einer iv.-Heparin-Injektion die Konzentration der unveresterten Fettsäuren im Plasma etwa auf das zweifache des Ausgangswertes ansteigt. Heparin wird in neuester Zeit in nichtgerinnungshemmenden Dosen auch zur Prophylaxe der Arteriosklerose und des Herzinfarktes mit Erfolg angewandt, wobei der Wirkungsmechanismus noch im wesentlichen unklar ist. Nach der Auffassung von DEUTSCH (21), BÖHLE und Mitarbeiter (5), ZWEIFLER (60), u.v.a. ist jedoch über eine Minderung der Thrombozytenzusammenlagerung eine Möglichkeit gegeben, arteriosklerotischen Veränderungen zu begegnen.

Die Hemmung der Aggregation und der Adhäsion der Thrombozyten ist nicht nur im Rahmen der Arteriosklerose von Interesse. Ihr kommt vielmehr im Zusammenhang mit der Prophylaxe und der Therapie thromboembolischer Erkrankungen und möglicherweise auch bei bestimmten Schockzuständen besondere Bedeutung zu, da hierbei die Zusammenlagerung von Thrombozyten einen wesentlichen Faktor der Weiterentwicklung der genannten Krankheitsbilder darstellt.

F: Zusammenfassung

Im Hinblick auf die von EHRLY und MÜLLER beschriebene Erythrozytenaggregat-desaggregierende Wirkung des Natrium-Oleats, als Vertreter der im Plasma vorkommenden freien, ungesättigten Fettsäuren, wurden Untersuchungen über den Einfluß der gleichen Substanz auf die Aggregation der Thrombozyten angestellt.

Mit Hilfe der BORN'schen Methode, die auf der Messung der optischen Dichte plättchenreicher Plasmen beruht, und an Hand von phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß physiologische Konzentrationen von Natrium-Oleat (10-40 mg%) keine Aggregation der Thrombozyten verursachen. Nach Zugabe von 160 mg% Natrium-Oleat zu plättchenreichem Plasma konnte eine geringgradige Aggregation lediglich mikroskopisch nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener Natrium-Oleat-Konzentrationen auf die ADP-induzierte Aggregation der Thrombozyten untersucht. Dabei wurde eine mäßiggradige desaggregierende Wirkung niedriger Konzentrationen von Natrium-Oleat (10, 20 mg%) gefunden. Diese Konzentrationen wirkten hemmend auf die Bildung von ADP-induzierten Aggregaten und beschleunigten deren Aufspaltung. Zugabe von Natrium-Oleat in einer Endkonzentration von 40 mg% zeigte keine eindeutige Beeinflussung der künstlich zusammengelagerten Thrombozyten. Bei der weiteren Erhöhung der zugesetzten Natrium-Oleat-Konzentration (80 und 160 mg%) konnte eine Verstärkung der ADP-induzierten Aggregation beobachtet werden. Die aggregationsfördernde Wirkung nahm dabei mit steigender Konzentration von Natrium-Oleat zu.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden mit entsprechenden Arbeiten anderer Autoren verglichen. Außerdem wurden Überlegungen über den möglichen Mechanismus der beobachteten Desaggregation von Thrombozytenaggregaten angestellt.

G: Literaturverzeichnis

1. ARDLIE, N.G., KINLOUGH, R.L., GLEW, G. and SCHWARTZ, C.J.:
Fatty acids and in vitro platelet aggregation.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 44, 105-110, (1966).
2. AZNAR, J.: Hemmung der Thrombozyten-Aggregation durch
SP 54 in vitro. (Veröffentlichung in Vorbereitung)
3. AZNAR, J. y BAGUENA, R.: Sobre un nuevo mecanismo de
accion antithrombotica de los heparinoides. Medi-
cina Espanola, Tomo LVII, 177-186, (1967).
4. BIZZOZERO, G.: Über einen neuen Formbestandteil des
Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und
der Blutgerinnung. Virchows Arch. Path. Anat. 90,
261-332, (1882).
5. BÖHLE, E., BAUKE, J., HARTMUTH, E. und K.BREDDIN : Unter-
suchungen über die Agglutination der Blutplättchen
nach Zufuhr verschiedener Nahrungsfette. Klin. Wschr.
43, 555-562, (1965).
6. BORN, G.V.R.: Adenosinetriphosphate (ATP) in blood plate-
lets. Biochem. J. 62, 33P, (1956).
7. BORN, G.V.R.: The break-down of adenosinetriphosphate in
blood platelets during clotting. J. Physiol. 133,
61P, (1956).
8. BORN, G.V.R.: Aggregation of blood platelets by adenosine
diphosphate and its reversal. Nature 194, 927-929,
(1962).
9. BORN, G.V.R. and CROSS, M.J.: The aggregation of blood plate-
lets. J. Physiol. 168, 178-195, (1963).
10. BRAUNSTEINER, H.: Thrombopathie und Thrombasthenie. Wien.
Ztschr. Inn. Med. 36, 421-471, (1955).
11. BRAUNSTEINER, H. und PAKESCH, F.: Thrombocytoasthenia and
Thrombocytopathia - Old Names and New Diseases.
Blood 11, 965-976, (1956).

12. BREDDIN, K.: Zur Messung der Thrombozytenadhäsivität. Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttg.), Vol. XII, 269-281, (1964).
13. BREDDIN, K.: Über die gesteigerte Thrombozytenagglutination bei Gefäßkrankheiten. Schweiz. med. Wschr. 95, 655-660, (1965).
14. BREDDIN, K.: Thrombozytenagglutination bei Gefäßkrankheiten. Med. Welt 17, (N.F.), 2322-2324, (1966).
15. CONNOR, W.E.: The acceleration of thrombus formation by certain fatty acids. J. Clin. Invest. 41, 1199-1205, (1962).
16. CONNOR, W.E. and POOLE, J.C.F.: The effect of fatty acids on the formation of thrombi. Quart. J. exp. Physiol. 46/1, 1-7, (1961).
17. CONNOR, W.E., HOAK, J.C. and WARNER, E.D.: Massive thrombosis produced by fatty acid infusion. J. Clin. Invest. 42, 860-866, (1963).
18. CONNOR, W.E., HOAK, J.C. and WARNER, E.D.: The role of lipids in thrombosis. Pathogenesis and treatment of thromboembolic diseases. F.K. Schattauer-Verlag, Stuttg., 193-208, (1966).
19. CUNNINGHAM, G.M., McNICOL, G.P., DOUGLAS, A.S.: Effect of anticoagulant drugs on platelet aggregation in the Chandler's tube. The Lancet, No. 7388, 729-730, (1965).
20. DAY, H.J., FEWELL, W. and SOLOFF, L.A.: Thrombosis in the dog produced by single rapid infusions of long chain saturated fatty acids. Am. J. Med. Sci. 253, 113-123, (1967).
21. DEUTSCH, E.: Die Antikoagulantien in der Therapie der peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen. Wien. klin. Wschr. 76, 151-153, (1964).
22. DOLE, V.F. und MEINERTZ, H.: Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. J. biol. Chem. 235, 2595, (1960).

23. EBERT, J.C. und SCHIMMELBUSCH, C.: Experimentelle Untersuchungen über Thrombose. Virchows Arch.Path.Anat. 103, 39-87, (1886).
24. EHRLY, A.M.: Über den Einfluß freier Fettsäuren auf die Viscosität des Blutes. Ztschr.ges.exp.Med.142, 205-215, (1967).
25. EHRLY, A.M.: Hämorheologische Probleme bei Venenerkrankungen. Zentralblatt für Phlebologie 6, Nr.2, 338-343, (1967).
26. EHRLY, A.M.: Untersuchungen über Wirkung und Wirkungsmechanismus verschiedener oberflächenaktiver Substanzen und Pharmaka auf Erythrozytenaggregate, die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, die Viskosität und den Hämatokrit menschlichen Blutes. Ärztl. Forschung 21, 323-334, (1967).
27. EHRLY, A.M. und MÜLLER, H.E.: Aggregation und Desaggregation von Erythrozyten. Acta haemat.36, 323-334, (1966).
28. EHRLY, A.M., GRAMLICH, F. und MÜLLER, H.E.: Die Verteilung von ¹³¹Jod-markierter Ölsäure zwischen Plasma und Erythrozyten. Blut 11, 284-290, (1965).
29. FRENCH, J.E.: Blood platelets: Morphological studies on their properties and life cycle. Brit.J.Haemat.13, 595-603, (1967).
30. GAARDER, A., JONSEN, J., LALAND, S., HELLEF, A. and OWREN, P.A.: Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. Nature 192, 531-532, (1961).
31. GROSS, R., NIEMEYER, G. und REUTER, H.: Untersuchungen über die Aggregation menschlicher Blutplättchen. I. Standardisierte Methoden zur quantitativen Bestimmung der Aggregation. Klin.Wschr.45, 931-939, (1967).
32. HASLAM, R.J.: Role of adenosin diphosphate in the aggregation of human blood-platelets by thrombin and by fatty acids. Nature 202, 765-768, (1964).

33. HAYEM, G.: Sur la mécanisme de l'arrêt des hémorrhagies.
C.R.Acad.Sci.(Paris) 95, 18-21, (1882).
34. HELLEM, A.J.: The adhesiveness of human blood platelets
in vitro. Scand.J.Clin.Lab.Invest. 12, (Suppl.51),
1-117, (1960).
35. HOAK, J.C., CONNOR, W.E. and WARNER, E.D.: Thrombogenic
effects of albumin-bound fatty acids. Arch.Path.
81, 136-139, (1966).
36. HOAK, J.C., WARNER, E.D. and CONNOR, W.E.: Platelets, fatty
acids and thrombosis. Circul.Res. 20, 11-17, (1967).
37. HOVIG, T.: Release of a platelet-aggregating substance
(adenosine diphosphate) from rabbit blood plate-
lets induced by saline "extract" of tendons.
Thromb.Diathes.Haemorrh. 9, 264-278, (1963).
38. ISSELHARD, W.: Akuter Sauerstoffmangel und Wiederbelebung.
Dtsch.Med.Wschr. 90, 349-356, (1965).
39. JENEVEIN jr., E.P., WEISS, D.L.: Platelet microemboli asso-
ciated with massive blood transfusion. Amer.J.
Path. 45, 313, (1964).
40. KAHLKE, W.: Lipide. Fortschr.Med. 83, 517-519, (1965).
41. KERR, J.W., PIRRIE, R., MACAULEY, I., BRONTE-STEWART, B.:
Platelet-aggregation by phospholipids and free
fatty acids. The Lancet, No.7399, 1296-1299, (1965).
42. KONITZER, K. et al.: Eine einfache Methode zur kolorime-
n Bestimmung der unveresterten langkettigen
Fettsäuren im Plasma. Acta biol.med.german. 12,
502, (1964).
43. MAHADEVAN, V., SING, H. and LUNDBERG, W.O.: Effects of
saturated and unsaturated fatty acids on blood
platelet aggregation in vitro. Proc.Soc.Exp.Biol.
Med. 121, 82-85, (1966).
44. MANNUCCI, P.M. and SHARP, A.A.: Platelet volume and shape
in relation to aggregation and adhesion. Brit.J.
Haemat. 13, 604-617, (1967).

45. MARCUS, A.J. and ZUCKER, M.B.: The physiology of blood platelets. Recent biochemical, morphologic and clinical research. Grune & Stratton, Inc., New York and London, S.58, (1965).
46. MITCHELL, J.R.A. and SHARP, A.A.: Platelet clumping in vitro. Brit.J.Haemat.10, 78-93, (1964).
47. MÜLLER-SEIFERT: Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik. Verlag von J.F. Bergmann, München, S.617, (1966).
48. MUSTARD, J.F., GILBERT, J., MURPHY, E.A.: Long-term effects of intermittent low doses of heparin on platelet economy in man. The Lancet No.7385, 575-576, (1965).
49. O'BRIEN, J.R.: The adhesiveness of native platelets and its prevention. J.clin.Pathol.14, 140-149, (1961).
50. O'BRIEN, J.R.: Platelet aggregation, Part I Some effects of the adenosine diphosphate, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness. J.clin. Pathol.15, 446-452, (1962).
51. O'BRIEN, J.R.: The effect of the alkyl tins on platelet aggregation. Thromb.Diathes.Haemorrh.9, 330-334, (1963).
52. O'BRIEN, J.R.: A comparison of platelet aggregation produced by seven compounds and a comparison of their inhibitors. J.clin.Pathol.17, 275-281, (1964).
53. REIN-SCHNEIDER: Physiologie des Menschen. Springer Verlag, 15.Aufl. 180-184, 2-9, (1964).
54. SAKAI, Y. and LEWIS, F.J.: A study of platelet aggregation and blood velocity in vitro. J.Thor.Cardiovasc. Surg.49, 982-993, (1965).
55. SHARP, A.A.: Platelet (viscous) metamorphosis. Blood platelets (Boston, Little, Brown & Comp.), 67-88, (1961).
56. SHARP, A.A.: Present status of platelet aggregation. New Engl.J.Med.272, 89-92, (1965).

57. SLACK, J., SEYMOUR, J., MCDONALD, L. and LOVE, F.:
Lipoprotein-lipase levels and platelet stickiness
in patients with ischaemic heart-diseases and in
controls, distinguishing those with an affected
first-degree relative. The Lancet No.7368,1033-
1037,(1964).
58. SOLOFF, L.A., WIEDEMAN, M.P.: Biomicroscopic observations
on vasoconstrictive and thrombogenic effects pro-
duced by long-chain saturated fatty acids within
the vasculature of the wing of an unanaesthetized
bat. Nature, 199,495-496,(1963).
59. ZBINDEN, G.: Transient thrombopenia after intravenous in-
jection of certain fatty acids. J.Lipid Res.5,
378-384,(1964).
60. ZWEIFLER, A.J.: Impairment of platelet function and throm-
bus growth in reserpine-treated rabbits. J.Lab.
Clin.Med.70,16-22,(1967).

Herrn Professor Dr. R. Duesberg, Direktor der I. Medizinischen Klinik der Universität Mainz, möchte ich für die großzügige Unterstützung und das Überlassen des Arbeitsplatzes danken.

Herrn Privatdozent Dr. F. Gramlich bin ich für seine Anregungen und für seine freundlichen Hinweise zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. A. M. Ehrly sei für die Überlassung des Themas und seine wertvolle Hilfe während der Arbeit besonders gedankt.

Herrn Privatdozent Dr. H. J. Lange (Institut für medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Mainz; Direktor: Professor Dr. Dr. S. Koller) möchte ich für seine Beratungen beim Auswerten der Ergebnisse und bei deren Darstellung danken.

Lebenslauf

Am 21. Dezember 1943 wurde ich, Hans-Günther Döppenschmidt, als Sohn des damaligen Berufsschuldirektors Dr. Josef Döppenschmidt und seiner Ehefrau Anna-Maria, geb. Sellinger, in Germersheim geboren.

Ab Herbst 1949 besuchte ich die Volksschule in Germersheim. Vom Frühjahr 1954 bis Frühjahr 1963 war ich Schüler des staatlichen naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Germersheim. An dieser Anstalt legte ich am 5. März 1963 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Sommersemester 1963 begann ich mein Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich im Oktober 1965 die ärztliche Vorprüfung bestand. Nach einem Semester an der Universität in Wien immatrikulierte ich mich wieder an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Ich beabsichtige, im Sommer 1968 die ärztliche Prüfung abzulegen.

